Iranian Journal of Field Crops Research
Homepage: https://jcesc.um.ac.ir

Research Article
Vol. 22, No. 1, Spring 2024, p. 1-14

Evaluation of Application Effects of Nitrogen Levels under Drought Stress Condition on Physiological Characteristics and Yield of Kochia (*Kochia scoparia*) in Saline Agriculture

L. Kooshki[1], H. R. Khazaie[2], M. Kafi[2], M. Goldani[2]

1- Ph.D. Student of Plant Physiology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2- Professor, Department of Agrotechnology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(*- Corresponding Author Email: h.khazaie@um.ac.ir)

Received: 16 March 2021 Revised: 12 September 2021 Accepted: 14 September 2021 Available Online: 14 September 2021	**How to cite this article:** Kooshki, L., Khazaie, H. R., Kafi, M., & Goldani, M. (2024). Evaluation of Application Effects of Nitrogen Levels under Drought Stress Condition on Physiological Characteristics and Yield of Kochia (*Kochia scoparia*) in Saline Agriculture. *Iranian Journal of Field Crops Research*, *22*(1), 1-14. (in Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jcesc.2021.68928.1037

Introduction

Nowadays, the cultivation of plants adapted to adverse conditions, such as drought and salinity, in the country has been considered. Meanwhile, *Kochia scoparia*, one of the forgotten plants, due to its classification in the group of halophytes, has specific characteristics suitable for cultivation in low-water and saline areas (Salehi, Kafi, & Kiani, 2012). This plant is known as an important annual forage crop, and its grains also have high nutritional value and oil, which can be considered for future industrial applications (Salehi *et al.*, 2012). Studies on the salinity tolerance of the Kochia plant have shown that it is suitable for cultivation in saline areas, and in terms of quantity and quality, can compete with conventional forage plants. The use of natural organic materials, such as humic acid, has received more attention. These materials, as part of soil organic matter, are influenced by physical, chemical, and microbiological changes in biological molecules (Sabzevari & Khazaei, 2009; Dong, Córdova-Kreylos, Yang, Yuan, & Scow, 2009). Additionally, nitrogen is the most important element needed for plant growth and development. It is also a key component in many biological compounds, including proteins, nucleic acids, some hormones, and chlorophyll. Nitrogen plays an essential role in photosynthetic processes and the final function of plants (Kaur, Gupta, & Kaur, 2002; Taiz, Zeiger, Møller, & Murphy, 2015). As a result of this research, a combination of nitrogen and humic acid can be used as nutritional resources in salt stress conditions.

Materials and Methods

This experiment was conducted in the form of split plots based on the randomized complete block design with three replications in the Saline Research Farm of Ferdowsi University of Mashhad in the 2015 growth season. The main plot included drought stress with a four-week interruption of irrigation at three levels of control (irrigation until the end of the growing season), after establishment (50 days after planting), the beginning of flowering (71 days after planting) and late flowering (82 days after planting) The subplot was included nitrogen application at three levels of zero, 100 and 200 kg.ha^{-1} from urea fertilizer source. The optimum level of humic acid (2 per thousand) was done as seed at the time of planting for all treatments.

Results and Discussion

The results showed that the drought stress during vegetative and reproductive growth stages had a negative effect on the Kochia plant. However, its effect in the early stages of vegetative growth (after establishment) was

https://doi.org/10.22067/jcesc.2021.68928.1037

greater than the stress at the end of the season (late flowering). Drought stress has a negative effect on Kochia grain yield by reducing the concentration of chlorophyll a, altering the chlorophyll a to b ratio, decreasing carotenoid concentration, and affecting relative leaf water content. However, seed treatments of humic acid and its combination with 100 kg.ha^{-1} nitrogen level by increasing the concentration of total phenol, soluble carbohydrate concentration, and DPPH free radical scavenging capacity improved photosynthetic pigments and finally kochia grain yield. In general, the most suitable treatment for use in drought stress and saline water source conditions was the combined method of sowing humic acid seeds with 100 kg.ha^{-1} nitrogen fertilizer.

Conclusion

In general, the occurrence of drought stress in vegetative and reproductive growth stages had a negative effect on the kochia plant. However, its effect in the early stages of vegetative growth (after establishment) was greater than the stress at the end of the season (late flowering). The most suitable treatment was using the combined method of seed of humic acid with 100 kg.ha^{-1} nitrogen fertilizer.

Keywords: Antioxidant capacity, Humic acid, Photosynthetic pigments, Saline water

نشریه پژوهشهای زراعی ایران

Homepage: https://jcesc.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۲۲، شماره ۱، بهار ۱٤۰۳، ص ١٤-١

ارزیابی اثرات کاربرد سطوح نیتروژن در شرایط تنش خشکی بر خصوصیات فیزیولوژیکی و عملکرد کوشیا (*Kochia scoparia*) در کشاورزی شورزیست

لیلا کوشکی[۱]، حمیدرضا خزاعی[۲*]، محمد کافی[۲]، مرتضی گلدانی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳

چکیده

مقاومت بالای کوشیا به شوری خاک و آب موجب شده تا کشت گیاه در مناطق شور مورد توجه قرار گیرد. برای کاهش اثرات منفی شوری و تحریک رشد گیاه کاربرد اسید هیومیک و نیتروژن می‌تواند مفید واقع گردد. از این رو آزمایشی به‌صورت کرت‌های خردشده در قالب طرح پایه بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقات شوری دانشگاه فردوسی در سال ۱۳۹۴ انجام شد. کرت‌های اصلی شامل تنش خشکی به‌صورت قطع چهار هفته‌ای آبیاری در سه سطح شاهد (آبیاری تا انتهای فصل رشد)، بعد از استقرار (۵۰ روز بعد از کشت)، آغاز گلدهی (۷۱ روز پس از کشت) و اواخر گلدهی (۸۲ روز پس از کشت) و کرت‌های فرعی شامل مصرف نیتروژن در سه سطح صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار از منبع کود اوره بود. سطح بهینه اسید هیومیک (۲ در هزار) به‌صورت بذر مال در زمان کشت برای تمامی تیمارها انجام شد. تاثیر منفی تنش خشکی در مراحل اولیه رشد رویشی نسبت به تنش انتهای فصل بیشتر بود و از طریق کاهش غلظت کلروفیل a، غلظت کارتنوئیدها و درصد رطوبت نسبی برگ سبب کاهش عملکرد دانه کوشیا شد. تیمارهای تلفیق‌شده با سطح ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن از طریق افزایش غلظت فنل کل، غلظت کربوهیدرات محلول، ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH سبب بهبود رنگیزه‌های فتوسنتزی و در نهایت عملکرد دانه کوشیا گردید. مناسب‌ترین تیمار برای زراعت کوشیا در شرایط تنش خشکی و منبع آب شور مورد استفاده، روش تلفیقی بذر مال اسید هیومیک با ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن بود.

واژه‌های کلیدی: آب شور، اسید هیومیک، رنگیزه‌های فتوسنتزی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

ایران با قرار گرفتن در عرض جغرافیایی ۲۵ تا ۳۸ درجه شمالی، جزو مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان به‌حساب می‌آید (Kafi *et al.*, 2010). علاوه بر آن، تغییرات اقلیمی چند دهه اخیر نیز سبب تشدید خشکی و کاهش منابع آب با کیفیت در دسترس شده است (Salehi *et al.*, 2012). به‌عنوان نمونه، مکانیسم‌های انتقال عناصر غذایی در گیاهان مانند جریان توده‌ای، انتشار و انتقال به‌وسیله پدیده اسمز همگی تابعی از مقدار رطوبت و پتانسیل منفی ناشی از شوری خاک است (Taiz *et al.*, 2015; Kaya *et al.*, 2020). از این‌رو، تولید بسیاری از گیاهان زراعی متداول در شرایط پیش رو با چالش‌های بسیاری مواجه خواهد بود.

امروزه کشت گیاهان سازگار به شرایط نامساعد محیطی از جمله خشکی و شوری در کشور مورد توجه قرار گرفته است. در این بین، گیاه کوشیا (*Kochia scoparia*) یکی از گیاهان مستعد به‌شمار می‌آید که به دلیل طبقه‌بندی آن در گروه هالوفیت‌ها، دارای ویژگی‌های اختصاصی مناسب برای کشت در مناطق کم‌آب و شور است (Salehi *et al.*, 2012; Riasi, Danesh Mesgaran, Stern, & Ruiz Moreno, 2008). این گیاه به‌عنوان یک محصول علوفه‌ای یک‌ساله مهم شناخته شده و دانه‌های آن نیز دارای ارزش غذایی و روغن بالا است که می‌توان علاوه بر تغذیه دام برای آن در آینده کاربردهای صنعتی نیز متصور شد (Salehi *et al.*, 2012). مطالعات بر روی تحمل به شوری گیاه کوشیا نشان داده که مناسب برای کشت در مناطق شور بوده و از نظر کمیت و کیفیت قابلیت رقابت با گیاهان علوفه‌ای متداول را داراست. در همین راستا، نتایج پیشین

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- استاد گروه اگروتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

(*- نویسنده مسئول: Email: h.khazaie@um.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/jcesc.2021.68928.1037

بیان‌گر قابلیت رشد و تولید بذر اکوتیپ‌های بومی کوشیا در شوری ۱۶/۵ الی ۴۲ دسی‌زیمنس بر متر بوده است (Salehi *et al.*, 2012; Nabati, Kafi, Masoumi, Zare Mehrjerdi, & Boroumand Rezazadeh, 2018). از این‌رو می‌توان از کوشیا به‌عنوان یکی از گزینه‌های اصلی کشت با محوریت تولید علوفه در مناطق دارای کشاورزی شورزیست استفاده نمود (Riasi *et al.*, 2008). با این حال، برای بهبود رشد و افزایش کیفیت این گیاه شورزیست می‌بایست تغذیه آن با عناصر غذایی مد نظر قرار گیرد.

امروزه کاربرد مواد آلی طبیعی همچون مواد هیومیکی مورد توجه قرار گرفته است. این مواد به‌عنوان بخشی از مواد آلی خاک از تحولات فیزیکی، شیمیایی و میکروبیولوژیکی مولکول‌های زیستی ناشی می‌گردند (Sabzevari & Khazaei, 2009; Dong *et al.*, 2009). حدود ۸۰ درصد از کل کربن خاک و ۶۰ درصد از کربن موجود در بسترهای آبی از مواد هیومیکی ساخته شده است. مواد هیومیکی در واقع طیف وسیعی از ترکیبات آلی و معدنی گوناگون نظیر اسیدهای آمینه، پپتیدها، فنل‌ها، اسیدهای نوکلئیک در پیوند با انواع کاتیون‌ها می‌باشند که در ترکیب با بسترهای کشت و محلول‌های غذایی نقش موثری در بهبود رشد و نمو گیاهان ایفا می‌نماید (Aiken, McKnight, Wershaw, & Mac Carthy, 1985; Moosavi, 2019). مواد هیومیکی از طریق القای کربن و متابولیسم نیتروژن، واکنش‌های مختلف گیاهان را تحریک می‌کنند (Dong *et al.*, 2009). مواد هیومیکی سبب تحریک آنزیم‌های مرتبط با مسیر جذب نیتروژن از جمله نیترات ردوکتاز، گلوتامات دهیدروژناز و گلوتامین سنتتاز می‌شوند (Dong *et al.*, 2009; Kaya *et al.*, 2020) و می‌توانند در فرایند جذب کودهای نیتروژنه معمول نقشی اساسی ایفا نمایند.

از کاربردهای جدید مواد هیومیکی در کشاورزی کاهش اثرات منفی تنش خشکی است. یافته‌ها نشان داده که تحت تنش کم‌آبی، تغذیه گیاه با مولکول‌های آلی موجب نگهداری محتوای آب برگ‌ها، افزایش فتوسنتز و سوخت و ساز آنتی‌اکسیدان‌ها می‌گردد (Saruhan, Kusvuran, & Babat, 2011; Shen *et al.*, 2020). همچنین اسید هیومیک طول ریشه، تعداد ریشه و انشعابات ریشه را افزایش می‌دهد و تحریک رشد ریشه معمولاً آشکارتر از رشد ساقه صورت می‌پذیرد (Khazaei, Nezami, Eyshi Rezaei, Saeidnejad, & Pouramir, 2013; Hatami, 2017). در ادامه، نتایج پژوهش‌ها نشان داده است که گیاهانی که در معرض تنش خشکی بودند، فشار اسمزی آن‌ها با حفظ آب و آماس سلولی در پاسخ به مواد هیومیک تنظیم شده است (Azevedo & Lea, 2011). تولید گونه‌های فعال اکسیژن تحت شرایط تنش خشکی برای گیاهان مضر است. چون مهار آنزیم‌ها، تجزیه کلروفیل، صدمه به مولکول‌های آلی از جمله DNA و پراکسیداسیون چربی را موجب می‌شوند (Apel & Hirt, 2004). نتایج نشان داده که کاربرد اسید هیومیک با تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی آنزیمی مانند کاتالاز، سوپر اکسید دسموتاز و غیرآنزیمی شامل ترکیباتی مانند آسکوربات، گلوتاتیون، آلکالوئیدها، فنل‌ها و کارتنوئیدها نقش مهمی در تخفیف اثرات تنش در گیاه دارد (Pizzeghello, Nicolini, & Nardi, 2001; Kaya *et al.*, 2020).

نیتروژن به‌عنوان مهم‌ترین عنصر مورد نیاز برای رشد و نمو گیاهان و همچنین جزو کلیدی در بسیاری از ترکیبات زیستی از جمله پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک، برخی از هورمون‌ها و کلروفیل می‌باشد و نقش مهمی در فرایندهای فتوسنتزی و عملکرد نهایی گیاه به عهده دارد (Kaur *et al.*, 2002; Taiz *et al.*, 2015). در اثر کمبود نیتروژن به علت کاهش شاخص سطح برگ و دوام سطح برگ، نسبت فتوسنتز گیاه زراعی همچنین عملکرد بیولوژیک گیاه کاهش می‌یابد (Kafi *et al.*, 2010; Tran *et al.*, 2014). مصرف متعادل کودهای شیمیایی به‌ویژه کودهای نیتروژن برای دستیابی به میزان بهینه محصول و در عین حال کاهش خطرات زیست‌محیطی ضروری به نظر می‌رسد (Rezaei Sokht-Abandani, Siadat, Pazoki, Lak, & Mojaddam, 2020). در شرایط تنش خشکی، نقش کود نیتروژن در بهبود فعالیت‌های فتوسنتزی، بیوشمیایی، توسعه ریشه و عملکرد در گونه‌های مختلفی همچون نیشکر (*Saccharum officinarum*) (Dinha, Watanabea, Takaragawa, Nakabarua, & Kawamitsu, 2017)، آفتابگردان (*Helianthus annus* L.) (Gholinezad, Aynaband, Hassanzade ghorthapeh, Noormohamadi, & Bernousi, 2009)، چغندر قند (*Beta vulgaris* L.) (Saravia *et al.*, 2016) و برنج (*Oryza sativa* L.) (Tran *et al.*, 2014) گزارش شده است.

با توجه به کمبود شدید آب کشاورزی در اکثر مناطق کشور، بروز تنش خشکی در مراحل مختلف رشدی گیاهان زراعی امری اجتناب‌ناپذیر است. همچنین، امروزه به‌منظور جبران کمبود آب در بخش کشاورزی، استفاده از آب‌های نامتعارف مورد توجه قرار گرفته است. از سویی دیگر، به‌منظور حفظ تولیدات کشاورزی در مناطق خشک دارای آب شور، کشت گیاهان مقاوم و مناسب در این مناطق از جمله گیاه کوشیا ضروری به نظر می‌رسد. از سویی دیگر جهت بهبود کمی و کیفی رشد به‌ویژه در گیاهان علوفه‌ای، استفاده از منابع کودی امری ضروری است. بدین منظور در این تحقیق استفاده از کود نیتروژن و اسید هیومیک به‌عنوان منابع تغذیه‌ای گیاه کوشیا در شرایط تنش خشکی و با منبع آب شور مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آزمایش به‌صورت کرت‌های خردشده در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقات شوری قطب

علمی زراعت (گیاهان ویژه) دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد واقع در ۱۵ کیلومتری شرق مشهد و در محدوده چاه شماره ۳۱ مزرعه نمونه آستان قدس رضوی، با مختصات طول جغرافیایی ۵۹ درجه و ۳۶ دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۱۶ دقیقه شمالی و ارتفاع از سطح دریا برابر ۹۸۵ متر، در تابستان سال ۱۳۹۴ انجام شد. کرت اصلی آزمایش شامل تنش خشکی به‌صورت قطع چهار هفته‌ای آبیاری در سه سطح شاهد (آبیاری تا انتهای فصل رشد)، بعد از استقرار (۵۰ روز بعد از کشت)، آغاز گلدهی (۷۱ روز پس از کشت) و اواخر گلدهی (۸۲ روز پس از کشت) بود. مطابق با طرح آزمایش، از ابتدای کشت تا زمان‌های مورد نظر، آبیاری به روال معمول انجام شد. سپس با توجه به نوع تیمار؛ در مرحله رشدی مورد نظر چهار هفته قطع آبیاری اعمال گردید و پس از آن آبیاری به‌صورت معمول انجام گرفت. کرت فرعی شامل مصرف نیتروژن در سه سطح صفر، ۱۰۰ و ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار از منبع کود اوره بود (Khaninejad, 2010). سطح بهینه اسید هیومیک به‌صورت بذر مال دو در هزار در زمان کشت برای تمامی تیمارها صورت گرفت. خاطر نشان می‌شود که بیشترین مقدار تیمار نیتروژن بر پایه مطالعه پیشین، ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار بوده است. اما با توجه به عدم وجود رقم اصلاح‌شده در این گیاه و استفاده از توده‌های متنوع، امکان واکنش‌های متفاوت دور از انتظار نبود. لذا سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ کیلوگرم کود نیتروژن مورد استفاده قرار گرفت.

پیش از شروع آزمایش، یک نمونه مرکب از خاک عمق صفر الی ۳۰ سانتی‌متری خاک برداشت شد و خصوصیات شیمیایی آن تعیین شد (جدول ۱). جهت آماده‌سازی زمین، عملیات شخم و دیسک‌زنی صورت گرفت و سپس با لولر سطح زمین هموار گردید و ردیف‌های مورد نظر زده شد. کشت مزرعه در تاریخ ۱۳۹۴/۰۵/۰۱ صورت گرفت. بذر تمامی تیمارها قبل از کشت به مدت ۲۴ ساعت با اسید هیومیک حل‌شده در آب با نسبت دو در هزار بذرمال و در محیط باز قرار داده شد تا خشک شوند. اسید هیومیک مورد استفاده از شرکت رووِنسا[1] و به‌صورت پودر خشک با ۸۰ درصد اسید هیومیک بود. تیمار اسید هیومیک بر اساس بررسی‌های اولیه گلخانه‌ای در این تحقیق به‌دست‌آمده و در شرایط مزرعه مورد استفاده قرار گرفت. سپس، بذر کوشیا بر روی ردیف‌هایی با فواصل ۵۰ سانتی‌متر کشت شدند. پس از سبز شدن، برای رسیدن به تراکم مطلوب، دو مرحله عملیات تنک کردن (۲۸ و ۴۱ روز پس از کاشت) انجام شد. به‌طوری‌که فاصله نهایی روی ردیف بوته‌ها به‌طور میانگین ۱۰ سانتی‌متر بود. در این آزمایش، ابعاد واحدهای آزمایشی ۶×۵ متر، فاصله واحدهای آزمایشی دو متر و فاصله بین بلوک‌ها نیز ۲/۵ متر بود.

واحدهای آزمایشی لوله‌کشی‌شده و هر دو ردیف با یک شیر آب آبیاری می‌شد. با این سیستم از مخلوط شدن آب بلوک‌ها و تیمارهای متفاوت جلوگیری شد. در تمام مراحل آبیاری، با استفاده از کنتور حجم آبیاری کنترل شد. به‌منظور ایجاد شوری ۲۰ دسی‌زیمنس بر متر آب آبیاری، از طریق حل نمودن نمک به میزان ۱۰ کیلوگرم در ۵۰۰۰ لیتر آب اولیه با مشخصات ارائه‌شده در جدول ۲ تامین گردید. در تمام دوره رشد، شوری آب آبیاری به روش یادشده، ثابت نگه داشته شد.

در مرحله رشد زایشی و یک هفته پس از اعمال آخرین تیمار تنش قطع آبیاری، نمونه‌برداری برگ کوشیا جهت اندازه‌گیری صفات فیزیولوژیک انجام شد. بدین منظور، برگ سالم کاملاً توسعه‌یافته بخش اندام هوایی کوشیا توسط تیغ ضدعفونی‌شده با اتانول ۷۰ درصد، از محل اتصال دم‌برگ به ساقه جدا و در داخل پلاستیک قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در داخل یخدان حاوی یخ به آزمایشگاه انتقال یافت. به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها برای اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی، مقدار مناسبی از نوک برگ‌های انتقال‌یافته به آزمایشگاه توزین گردید. اندازه‌گیری غلظت کلروفیل a، b به روش آرنون (Arnon, 1949) و کاروتنوئیدها به روش لیچنتالر و ولبرن (Lichtenthaler & Wellburn, 1983) در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۵۳ و ۶۶۶ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر جنوی (مدل Jenway ۶۳۰۵) انجام شد. غلظت کلروفیل‌های a، b و کاروتنوئیدها و غلظت کلروفیل کل به‌دست آمد (رابطه‌های ۱ الی ۴).

$$Chl_a = 15.65 \times A_{666} - 7.34 \times A_{653} \quad (1)$$

$$Chl_b = 27.05 \times A_{653} - 11.21 \times A_{666} \quad (2)$$

$$C(x+c) = (1000 \times A_{470} - 1.63 \times Chl_a - 104.96 \times Chl_b)/221 \quad (3)$$

$$Chl_{total} = Chl_a + chl_b \quad (4)$$

جهت اندازه‌گیری غلظت کربوهیدارت محلول برگ، مقدار متناسبی از بخش میانی برگ‌های انتقال‌یافته به آزمایشگاه توزین گردید. سپس با افزودن نیتروژن مایع توسط هموژنایزر نمونه‌ها به‌طور کامل پودر شد و مقدار مناسبی اتانول ۹۶ درصد اضافه گردید. پس از نگهداری نمونه‌ها در یخچال به مدت ۲۴ ساعت و دمای چهار درجه سانتی‌گراد، غلظت کربوهیدرات محلول به روش دبوس و همکاران (Dubois, Gilles, Hamilton, Rebers, & Smith, 1956) در طول موج ۴۸۰ نانومتر و با استفاده از استاندارد گلوکز اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری ظرفیت مهار فعالیت رادیکال آزاد (1,1-DPPH diphenyl-2-picrylhydrazyl)، مقدار متناسبی از نمونه‌های حاوی اتانول ۹۶ درصد را با DPPH محلول در اتانول (۰/۵ میلی‌مولار) مخلوط کرده و پس از قرار دادن مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی مطلق، میزان جذب توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد (Abe, Murata, & Hirota, 1998).

1- Rovensa

جدول ۱- ویژگی‌های شیمیایی خاک مزرعه‌ای به عمق صفر الی ۳۰ سانتی‌متر

Table 1- Soil chemical properties of experimental field (0-30 cm depth)

سولفات SO_4^{-2}	کلر Cl	بی‌کربنات HCO_3^-	کربنات CO_3^{-2}	پتاسیم K	سدیم Na	منیزیم Mg	کلسیم Ca	هدایت الکتریکی Electrical conductivity	بافت خاک Texture
meq l^{-1}								dS.m^{-1}	Clay-loam
13	27	1.8	0.0	0.8	31	10.2	10.6	5.8	

جدول ۲- ویژگی‌های شیمیایی آب اولیه مورد استفاده در آزمایش

Table 2- Water chemical properties for use of the experiment

سولفات SO_4^{-2}	کلر Cl	بی‌کربنات HCO_3^-	کربنات CO_3^{-2}	پتاسیم K	سدیم Na	منیزیم Mg	کلسیم Ca	هدایت الکتریکی Electrical conductivity
meq l^{-1}								dS.m^{-1}
15	34	2.4	0.4	0.2	32	9.2	6.6	5.2

ظرفیت مهار رادیکال‌های فعال با استفاده از استانداردهای اسید آسکوربیک به‌دست آمد. برای اندازه‌گیری غلظت فنل کل به روش فولین سیکالتو، در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد. از استاندارد گالیک اسید برای تعیین غلظت فنل کل استفاده شد (Singleton & Rossi, 1965). جهت اندازه‌گیری پرولین آزاد برگ، نمونه‌ها با نیتروژن مایع هموژنایزشده و با اسید سولفوسالیسیلیک سه درصد حل و سپس به مدت ۱۰ دقیقه و ۳۰۰۰ جی سانتریفیوژ شد. سپس به روش بیتس و همکاران (Bates, Waldran, & Teare, 1973) غلظت پرولین در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. در پایان، مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد پرولین به‌دست آمد.

به‌منظور اندازه‌گیری محتوای نسبی آب برگ، برگ سالم توسعه‌یافته از بخش فوقانی اندام هوایی به‌طور کامل جدا شده و در داخل یخ به محیط آزمایشگاه منتقل گردید و با ترازوی دارای دقت ۰/۰۰۱ گرم، وزن اولیه آن توزین شد. هر برگ در داخل ویال حاوی آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق غوطه‌ور گردید. سپس وزن تورژسانس آن توزین و جهت تعیین وزن خشک در داخل آون با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. در نهایت محتوای نسبی آب برگ (RWC) بر اساس رابطه (۵) به‌دست آمد (Mohsenzadeh, Malboobi, Razavi, & Farrahi-Aschtiani, 2006).

$$RWC = \frac{Wf - Wd}{Wt - Wd} \times 100 \qquad (۵)$$

در این معادله، Wf: وزن اولیه برگ، Wt: وزن برگ در حالت تورژسانس و Wd وزن خشک برگ است.

جهت تعیین درصد نشت الکترولیت غشای سلولی از هر بوته یک برگ جوان توسعه‌یافته جدا و به مدت ۲۴ ساعت در داخل ویال‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر قرار گرفت. سپس هدایت الکتریکی اولیه (EC_1) توسط دستگاه EC متر اندازه‌گیری شد. در ادامه ویال‌ها به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۳ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ بار اتوکلاوشده و پس از سردشدن، هدایت‌الکتریکی ثانویه (EC_2) قرائت شد. در نهایت درصد نشت الکترولیت توسط رابطه (۶) به‌دست آمد.

$$EL = (EC1 / EC2) \times 100 \qquad (۶)$$

تجزیه واریانس و مقایسات میانگین صفات در تمامی آزمایش‌ها توسط نرم‌افزار آماری SAS ver 9.1 انجام شد. در صورت معنی‌داری اثرات از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح پنج درصد استفاده شد. در صفاتی که اثرات متقابل معنی‌دار بود، از بررسی اثرات اصلی صرف‌نظر شد.

نتایج و بحث

رنگیزه‌های فتوسنتزی

تجزیه واریانس داده‌های آزمایش نشان داد که اثر اصلی زمان اعمال تنش خشکی و میزان مصرف کود نیتروژن بر صفات غلظت کلروفیل a، غلظت کلروفیل b، نسبت کلروفیل a به b و غلظت کارتنوئیدهای برگ کوشیا معنی‌دار بود. اثرات متقابل زمان اعمال تنش خشکی و میزان مصرف کود نیتروژن تنها در صفات غلظت کلروفیل b برگ معنی‌دار شد (جدول ۳).

غلظت کلروفیل a برگ کوشیا در تیمار تنش خشکی اعمال‌شده پس از استقرار گیاهچه به‌طور معنی‌داری در مقایسه با سایر تیمارهای تنش خشکی کاهش نشان داد. اما بین سایر تیمارهای تنش خشکی از این نظر تفاوتی مشاهده نشد (جدول ۴). اثرات منفی ناشی از تنش خشکی بر غلظت کلروفیل برگ توسط سایر محققان نیز گزارش شده است (Saravia *et al.*, 2016; Dinha *et al.*, 2017; Kaya *et al.*, 2020). همچنین غلظت کلروفیل در تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ کیلوگرم

در هکتار نیتروژن در مقایسه با عدم کاربرد نیتروژن (صفر) به‌ترتیب ۸/۹ و ۷/۹ درصد بیشتر بود (جدول ۴).

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات رنگیزه‌های فتوسنتزی برگ کوشیا تحت تیمارهای زمانی تنش خشکی و میزان کود نیتروژن
Table 3- Source of variance (mean square) of photosynthetic pigments of kochia leaves under time of drought stress and nitrogen application

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات (Mean square)			
		غلظت کلروفیلa Chlorophyll a content	غلظت کلروفیلb Chlorophyll b content	نسبت کلروفیل a به b Chlorophyll a to b ratio	غلظت کارتنوئیدها Carotenoids content
تکرار Replication	2	6.89ns	12.60*	0.06ns	51.8ns
زمان تنش خشکی Time of drought stress (TD)	3	120.42**	31.39*	0.15*	330.42**
خطای اصلی Main error	6	4.87	2.09	0.03	18.14
میزان کود نیتروژن Nitrogen application (N)	2	60.35*	57.94**	0.63**	797.59**
TD×N	6	19.33ns	20.82*	0.08ns	48.15ns
خطای فرعی Sub error	16	9.87	5.66	0.04	30.83
ضریب تغییرات C.V (%)	-	6.0	8.4	10.4	10.9

ns، * و **: به‌ترتیب به مفهوم غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد می‌باشد.
ns, * and **: are non-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively

با توجه به نقش موثر نیتروژن در ساخت اسیدهای آمینه و پروتئین‌های آنزیمی (Delfine, Tognetti, Desiderio, & Alvino, 2005; Taiz *et al*., 2015). می‌توان عنوان داشت که یکی از روش‌های افزایش غلظت کلروفیل در شرایط کاربرد نیتروژن ناشی از افزایش فعالیت‌های آنزیمی چرخه تولید آن بوده است. در همین رابطه رضایی سوخته آبادانی و همکاران (Rezaei sokht-Abadani *et al*., 2020) عنوان داشتند که نیتروژن از طریق تاثیر بر افزایش بیوسنتز پروتئین‌های آنزیمی سبب تحریک چرخه تولید آنزیم‌های سنتزکننده رنگیزه‌های فتوسنتزی می‌گردد. هرچند در شرایط ۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی، غلظت کلروفیل b در تیمار عدم مصرف نیتروژن در مقایسه با تیمارهای مصرف نیتروژن به‌طور معنی‌داری بالاتر بود، اما در تیمارهای تنش خشکی پس از استقرار، آغاز گلدهی و اواخر گلدهی تفاوتی بین سطوح نیتروژن از این نظر وجود نداشت (جدول ۶). کلروفیل‌های a و b به‌عنوان رنگیزه‌های اصلی در فرایند فتوسنتزی نقش موثری در کارایی سیستم انتقال انرژی و تبدیل آن دارند (Taiz *et al*., 2015; Shen *et al*., 2020). هرچند یافته‌های متعدد مبین اثر منفی تنش خشکی بر غلظت این رنگیزه‌ها است و حساسیت آن‌ها به شرایط تنش بیش از سایر رنگیزه‌ها برآورد شده (Dinha *et al*., 2017; Kaya *et al*., 2020)، اما نتایج این پژوهش نشان داد که کاربرد نیتروژن به همراه پیش‌تیمار بذر با اسید هیومیک در زمان کشت موجب بهبود غلظت آن‌ها در برگ‌های کوشیا شد. یافته‌های دیگر نیز نشان‌دهنده تاثیر مثبت تلفیق کودهای شیمیایی و آلی بر افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی در شرایط تنش بود (Khorasaninejad, Alizadeh Ahmadabadi, & Hemmati, 2018; Kaya *et al*., 2020) که با یافته‌های این پژوهش مطابقت داشت.

نسبت کلروفیل a به b در تیمار تنش خشکی اواخر گلدهی نسبت به سایر تیمارهای زمانی تنش خشکی به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. در حالی‌که بین سایر تیمارها از این نظر تفاوتی وجود نداشت (جدول ۶). با توجه به حساسیت بیشتر کلروفیل a نسبت به b در شرایط تنش (Khorasaninejad *et al*., 2018)، احتمالا در تیمارهای تنش اعمال‌شده در مراحل مختلف تا اوایل گلدهی به دلیل برقراری شرایط رطوبتی مطلوب بعد از تنش، گیاه فرصت کافی برای ترمیم غلظت کلروفیل a در برگ‌ها در زمان نمونه‌برداری را داشته و از این نظر با شاهد تفاوتی نشان نداده‌اند. اما در تیمار خشکی آخر فصل با توجه به نزدیکی به زمان نمونه‌برداری با زمان اعمال تنش و حساسیت بیشتر کلروفیل a به تنش و عدم فرصت کافی برای ترمیم با کاهش همراه بوده است. کاربرد نیتروژن در سطح ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار سبب افزایش معنی‌دار نسبت کلروفیل a به b در مقایسه با تیمار عدم مصرف نیتروژن شد. اما، بالاترین سطح نیتروژن از این نظر تاثیری بر گیاه کوشیا نداشت (جدول ۶). نسبت بالاتر کلروفیل a به b یکی از فاکتورهای مهم و نشان‌دهنده پتانسیل فتوسنتزی بیشتر گیاه است

(Shen *et al.*, 2020). لذا این نتایج نشان‌دهنده تاثیر مثبت تلفیق کاربرد اسید هیومیک بذر مال و نیتروژن در حد بهینه (۱۰۰ کیلوگرم در هکتار) بر بهبود نسبت کلروفیل a به b و به دنبال آن افزایش کارایی جذب نور و کیفیت سیستم فتوسنتزی است.

هرچند در شرایط اعمال تنش خشکی پس از استقرار گیاهچه کوشیا، غلظت کارتنوئیدهای برگ در مقایسه با تیمار عدم تنش اختلافی نداشت. اما اعمال تنش در زمان آغاز گلدهی و اواخر گلدهی در مقایسه با شاهد به‌ترتیب ۲۱/۵ و ۲۷/۴ درصد غلظت کارتنوئیدهای برگ بیشتر بود (جدول ۶). از آنجا که افزایش غلظت کارتنوئیدهای برگ (عنوان رنگیزه‌های کمکی) یکی از نشانه‌های ایجاد تنش در گیاه است و این رنگیزه‌ها نقش تخفیف‌دهنده تنش نوری ثانویه را در گیاه برعهده دارند (Taiz *et al.*, 2015; Khorasaninejad *et al.*, 2018; Shen *et al.*, 2020)، لذا می‌توان بیان داشت که با توجه به نزدیک بودن زمان تنش و نمونه‌برداری در دو تیمار تنش مرحله زایشی؛ گیاه کوشیا همچنان متاثر از شرایط تنش ایجاد شده بوده است. در حالی‌که بوته‌های تنش‌دیده در مراحل اولیه رشد، قادر به ایجاد تطابق جدید شده و در نتیجه غلظت کارتنوئیدهای آن‌ها به سطح متعادل (مشابه شاهد) رسیده است. همچنین نتایج نشان داد که مصرف ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار در مقایسه با عدم مصرف آن، غلظت کارتنوئیدهای برگ کوشیا را ۲۱/۳ درصد کاهش داد. اما تیمار ۲۰۰ کیلوگرم بر هکتار نیتروژن تاثیر معنی‌داری بر صفت یادشده نداشت (جدول ۶). با توجه به این نتایج، به نظر می‌رسد که تلفیق تیمار بذر مال اسید هیومیک و ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار با افزایش غلظت کلروفیل‌های a و b تاثیر کاهشی بر غلظت کارتنوئیدهای برگ داشته است.

جدول ٤- مقایسه میانگین اثرات زمان‌های مختلف اعمال تنش خشکی و نیتروژن بر صفات مختلف گیاه کوشیا در مزرعه

Table 4- Mean comparison effects of different times of drought stress and nitrogen consumption in combination with humic acid on different traits of kochia in the field

تیمار Treatment		غلظت کلروفیل a Chlorophyll a content ($mg.g^{-1}$ FW)	نسبت کلروفیل a به b Chlorophyll a to b ratio	غلظت کارتنوئیدها Carotenoids content ($mg.g^{-1}$ FW)	محتوی نسبی آب برگ Relative water content (%)
زمان تنش خشکی Time of drought stress	ظرفیت زراعی (شاهد) Field capacity (Control)	49.0	1.8	42.7	59
	پس از استقرار After establishment	43.0	1.8	42.8	52
	آغاز گلدهی Early of flowering	49.7	1.9	51.9	54
	اواخر گلدهی Late of flowering	51.3	2.1	54.4	53
	LSD 0.05	2.8	0.2	5.1	3
کود نیتروژن Nitrogen fertilizer ($kg.ha^{-1}$)	0	49.8	2.1	38.8	55
	100	49.3	1.8	54.5	52
	200	49.8	2.1	38.8	55
	LSD 0.05	2.5	0.2	4.4	4

صفات فیزیولوژیک و عملکرد دانه

بررسی نتایج جدول تجزیه واریانس داده‌ها حاکی از معنی‌داری اثر اصلی زمان اعمال تنش خشکی بر صفات محتوای نسبی آب برگ، درصد نشت الکترولیت‌ها، غلظت کربوهیدرات محلول، غلظت فنل کل، غلظت پرولین و ظرفیت مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH برگ کوشیا بود. به‌جز صفات درصد نشت الکترولیت‌ها و غلظت کربوهیدرات محلول برگ، اثر میزان مصرف کود نیتروژن بر سایر صفات فیزیولوژیک مورد بررسی و عملکرد دانه کوشیا معنی‌دار گردید. به‌جز محتوی نسبی آب برگ کوشیا، در سایر صفات مورد بررسی، اثرات متقابل زمان اعمال تنش خشکی و میزان مصرف کود نیتروژن معنی‌دار بود (جدول ۵).

با اعمال تنش خشکی در هر یک از مراحل رشد کوشیا، محتوی نسبی آب برگ در مقایسه با تیمار شاهد (ظرفیت زراعی) به‌طور معنی‌داری کاهش نشان داد و بین تیمارهای خشکی از این نظر اختلافی وجود نداشت. در همین رابطه عنوان شده که در شرایط تنش خشکی به دلیل محدودیت در جذب آب توسط ریشه، از محتوای نسبی آب برگ کاسته می‌شود (Khorasaninejad *et al.*, 2018; Kaya *et al.*, 2020). به طور کلی با افزایش میزان نیتروژن، محتوی آب نسبی برگ کوشیا کاهش نشان داد. با این حال، هرچند بین شرایط عدم مصرف و مصرف ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن، محتوی آب نسبی برگ تفاوتی نداشت، ولی در تیمار ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار کاهش معنی‌داری از این نظر مشاهده شد (جدول ۶).

جدول ۵- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) صفات فیزیولوژیک برگ و عملکرد کوشیا تحت زمان اعمال تنش خشکی و کاربرد نیتروژن

Table 5- Source of variance (mean square) of physiological traits in leaves and yield of kochia under time of drought stress and nitrogen application

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی d.f	میانگین مربعات (Mean square)						
		محتوی نسبی آب Relative water content	نشت الکترولیت‌ها Electrolyte leakage	غلظت کربوهیدرات محلول soluble carbohydrate content	غلظت فنل کل total phenol content	غلظت پرولین Prolin content	ظرفیت مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH DPPH radical scavenging capacity	عملکرد دانه Grain yield
تکرار Replication	2	19^{ns}	73^{ns}	0.09*	37^{ns}	0.8^{ns}	8^{ns}	7^{ns}
زمان تنش خشکی Time of drought stress (TD)	3	85*	574**	2.71**	7017**	56.3**	164*	19^{ns}
خطای اصلی Main error	6	9	49	0.01	157	0.5	26	14
میزان کود نیتروژن Nitrogen application (N)	2	82*	163^{ns}	0.03^{ns}	2314**	21.9**	130**	269**
TD×N	6	31^{ns}	156*	1.62**	4450**	6.1**	74*	73**
خطای فرعی Sub error	16	27	64	0.03	288	0.9	21	9
ضریب تغییرات C.V (%)	-	8.6	13.6	8.1	9.2	11.2	10.6	9.5

ns،* و** به‌ترتیب به مفهوم غیر معنی‌دار، معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد می‌باشد.

ns, * and **: are non-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively

به‌طور کلی، در شرایط تنش خشکی؛ درصد نشت الکترولیت تمامی تیمارهای کودی افزایش نشان داد. در همین رابطه، یافته‌های دیگر نیز مبین تاثیر منفی تنش خشکی بر تمامیت ساختار غشای سلولی و افزایش نشت یونی است (Saravia *et al.*, 2016; Kaya *et al.*, 2020). نتایج در این رابطه نشان داده که در شرایط تنش خشکی به دلیل افزایش گونه‌های فعال اکسیژن در سطح سلولی (Apel & Hirt, 2004)، تخریب ساختار غشایی از طریق اکسیداسیون سرعت یافته و در نهایت برهم خوردن تمامیت غشای سلولی و افزایش نشت یونی به‌وجود آمده است (Kafi *et al.*, 2010; Kaya *et al.*, 2020). در تیمار ظرفیت زراعی، تنها کاربرد ۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار سبب افزایش ۱۶/۳ درصدی و معنی‌دار نشت الکترولیت برگ کوشیا شد. در همین رابطه محققان بیان داشته‌اند که بیش‌بود نیتروژن می‌تواند سبب آبکی شدن بافت‌های گیاهی شود (Khaninejad, 2010; Rezaei Sokht-Abandani *et al.*, 2020) که این خود می‌تواند عامل موثری در افزایش قابلیت نشت برگ‌های تیمار ۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار باشد. در هر یک از تیمارهای اعمال خشکی پس از استقرار، آغاز گلدهی و اواخر گلدهی درصد نشت الکترولیت سطح ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن تغییر معنی‌داری نداشت. اما در سطوح صفر و ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن، افزایش معنی‌دار صفت یادشده نسبت به شرایط عدم تنش مشاهده شد. همچنین در هر یک از سطوح نیتروژن، بین تیمارهای زمانی اعمال تنش خشکی اختلافی از نظر درصد نشت الکترولیت مشاهده نشد (جدول ۶).

هرچند در شرایط عدم تنش، کاربرد ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن سبب افزایش معنی‌دار غلظت کربوهیدرات محلول برگ کوشیا شد. اما در هر سه تیمار زمانی تنش خشکی، صفت یادشده در سطح کودی مورد نظر به شدت کاهش نشان داد. تیمارهای عدم مصرف و مصرف ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در تنش خشکی پس از استقرار گیاهچه در مقایسه با شرایط عدم تنش به‌طور معنی‌داری از غلظت کربوهیدرات محلول برگ بالاتری برخوردار بودند. اما در دیگر تیمارهای زمانی تنش، صفت مورد نظر در آن‌ها کاهش نشان داد (جدول ۷).

جدول ٦- مقایسه میانگین اثرات متقابل زمان اعمال تنش خشکی و مصرف کود نیتروژن بر صفات فیزیولوژیک برگ کوشیا در مزرعه

Table 6- Mean comparison of interactions of effects of time of drought stress and nitrogen consumption on different traits of kochia in the field

زمان تنش خشکی Time of drought stress	کود نیتروژن Nitrogen fertilizer ($kg.ha^{-1}$)	غلظت کلروفیلb Chlorophyll b content ($mg.g^{-1}$ FW)	نشت الکترولیت‌ها Electrolyte leakage (%)	غلظت کربوهیدرات محلول Soluble carbohydrate content (mg glucose $.g^{-1}$ FW)	غلظت فنل Total phenol content (mg galic $acid.g^{-1}$ FW)	غلظت پرولین Prolin content ($mg.g^{-1}$ FW)	ظرفیت مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH DPPH radical scavenging capacity (mg $ascorbate.g^{-1}$ FW)	عملکرد دانه Grain yield ($g.m^{-2}$)
ظرفیت زراعی Field capacity	0	34.4	36.9	1.6	15.0	6.1	5.1	36.9
	100	23.7	47.8	1.5	17.5	3.7	3.4	33.8
	200	26.7	52.7	2.7	18.9	4.7	3.3	34.4
پس از استقرار After establishment	0	24.6	65.9	3.3	27.8	10.6	4.8	39.2
	100	22.5	68.8	3.2	21.3	11.8	4.9	28.3
	200	25.0	57.5	1.4	14.5	8.2	4.5	40.7
آغاز گلدهی Early of flowering	0	26.9	56.8	1.2	13.4	8.4	4.3	43.7
	100	23.9	58.8	1.3	16.4	5.2	4.5	28.3
	200	27.7	52.2	1.7	15.0	6.4	4.1	27.3
اواخر گلدهی Late of flowering	0	24.2	67.3	1.5	16.9	11.9	5.0	38.9
	100	23.4	65.9	1.7	15.9	9.7	4.8	32.4
	200	27.4	49.5	1.6	14.3	6.9	4.8	28.3
LSD 0.05		3.7	13.0	0.3	2.7	1.5	0.8	5.5

کربوهیدرات‌های محلول بـرگ بـه‌عنوان یکـی از اسـمولیت‌های موثر در شرایط تنش به‌شـمار می‌آینـد (Setayesh mehr, Khajeh, 2002; Kafi *et al.*, 2010) و با ایجاد پتانسیل اسـمزی (Esmaeilzadeh, & Sabbagh, 2012) در سلول سبب افزایش قابلیت جذب آب توسط سلول و کاهش اثـرات مخرب تنش بر ساختارهای داخـل سـلولی می‌گردنـد (Kaur *et al.*, 2002; Kafi *et al.*, 2010).

لذا افزایش غلظت این ترکیبات در تیمارهای تنش ابتدای فصل حاکی از واکنش گیاه به شرایط تنش بوده است. اما کاهش آن در تنش‌های زمانی دیگر، حاکی از عدم تطابق گیاه از این طریق در فازهای رشدی بالاتر به خشکی بوده است. همچنین با توجه به وجود ترکیبات آلی و محرک‌های رشد موثر در اسید هیومیک (Aiken *et al.*, 1985; Kaya *et al.*, 2020)، به نظر می‌رسد که تلفیق اسید هیومیک با تیمار بهینه ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار سبب افزایش قابلیت گیاه در تولید اسمولیت‌های کربوهیدراتی برای مقابله با تنش شده است.

در تیمار ظرفیت زراعی، مصرف ۲۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار اثر مثبت و معنی‌داری بر غلظت فنل کل برگ داشت. در حالی‌که در تیمارهای اعمال تنش خشکی پس از استقرار گیاهچه، آغاز و اواخر گلدهی به‌طور معنی‌داری از غلظت فنل کل برگ در سطح کودی یادشده کاسته شد. هرچند در تیمار تنش خشکی پس از استقرار گیاهچه، تنها تیمار اسید هیومیک بذر مال بالاترین غلظت فنل کل برگ را دارا بود. اما در سایر تیمارهای تنش، اختلافی بین عدم مصرف و مصرف ۱۰۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار وجود نداشت (جدول ۶). از آن‌جا که ترکیبات فنلی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گروه‌های مهارکننده اثرات منفی تنش شناخته می‌شوند و در گروه آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی قرار دارند (Kafi *et al.*, 2010; Setayesh mehr *et al.*, 2012). افزایش این ترکیبات در تیمار بذر مال اسید هیومیک حاکی از اثر آن بر افزایش توان تولید فنل در ساختار گیاهی برای مواجه با تنش است. همانند نتایج به‌دست‌آمده در این آزمایش، یافته‌های دیگر نشان داده که تحت تاثیر کاربرد کودهای آلی ورمی‌کمپوست و اسید هیومیک محتوی فنل و فلاونوئیدها در ساختار برگ مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad.) به‌طور معنی‌داری افزایش داشته است (Alizadeh, Najafi, Hadian, & Salehi, 2018).

به‌طور کلی، غلظت پرولین برگ کوشیا تحت تاثیر تیمارهای تنش خشکی نسبت به ظرفیت زراعی در هر سه سطح کودی افزایش نشان داد. باتوجه به آن‌که پرولین آزاد برگ یکی از ترکیبات اسمولیتی و تنظیم‌کننده در شرایط تنش بوده و افزایش آن به‌طور معمول یکی از فاکتورهای تعیین وجود اثرات تنش در گیاه است (Kafi *et al.*, 2010). از این‌رو، غلظت‌های بالاتر این ترکیب در سلول‌های برگی کوشیا نشان از واکنش‌های بیوشیمیایی در جهت مقابله با شرایط تنش خشکی القا شده می‌باشد. در ادامه، در تمامی سطوح تنش خشکی،

تیمار اسید هیومیک و عدم مصرف کود نیتروژن در مقایسه با سطوح ۱۰۰ و ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن بیشترین غلظت پرولین برگ را دارا بود (جدول ۶). باتوجه به این یافته‌ها می‌توان عنوان داشت که در شرایط تلفیق کاربرد اسید هیومیک و کود نیتروژن هم افزایی مثبت ناشی از آن، سبب افزایش توان گیاه برای مقابله با شرایط تنش خشکی شده و در نتیجه غلظت پرولین آزاد در این شرایط نسبت به کاربرد مجزای اسید هیومیک با کاهش همراه بوده است. آرو و همکاران (Arve, Torre, Olsen, & Tanino, 2011) نیز کاهش غلظت اسمولیت‌های گیاهی در شرایط تنش را نشانه‌ای از ایجاد سازگاری در گیاهان دانسته‌اند که این یافته‌ها با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. یافته‌های خراسانی نژاد و همکاران (Khorasaninejad *et al.*, 2018) در گیاه سرخارگل (*Echinacea angustifolia*) نیز حاکی از اثر مثبت کاربرد اسید هیومیک بر غلظت فنل کل برگ در شرایط تنش خشکی بوده است.

به‌طور کلی تنش خشکی باعث افزایش ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH برگ کوشیا شد. یافته مشابه نیز نشان‌دهنده تاثیر تنش خشکی بر افزایش غلظت و فعالیت سیستم آنزیمی و غیرآنزیمی آنتی‌اکسیدان گیاه است (Kaya *et al.*, 2020; Setayesh mehr *et al.*, 2012). هرچند در شرایط ظرفیت زراعی، مصرف کود نیتروژن نسبت به عدم مصرف آن سبب کاهش معنی‌دار ظرفیت مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH برگ کوشیا شد، اما در هر سه تیمار زمانی تنش خشکی، مصرف نیتروژن همراه با اسید هیومیک بذر مال در مقایسه با شرایط عدم تنش تاثیر مثبت و معنی‌داری بر ظرفیت مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH برگ داشت (جدول ۶). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (ظرفیت مهار فعالیت رادیکال آزاد DPPH) به‌طور معمول با ایجاد تنش در گیاهان افزایش می‌یابد که این سیستم متشکل از آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی از جمله آسکوربات، فنل‌ها و فالونوئیدها است (Nabati, 2010; Kafi *et al.*, 2010). از سویی دیگر در شرایط تنش خشکی به دلیل ایجاد تنش‌های ثانویه اکسیداتیو و نوری در گیاه تولید گونه‌های فعال آزاد اکسیژن به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد (Apel & Hirt, 2004; Setayesh mehr *et al.*, 2012) که اثرات مخربی بر ساختارهای سلولی به‌ویژه غشاهای پلاسمایی دارد (Kafi *et al.*, 2010). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این آزمایش، به نظر می‌رسد که تلفیق کاربرد اسید هیومیک و کود نیتروژن سبب هم‌افزایی مثبت در تحریک سیستم آنتی‌اکسیدانی کل گیاه شده و ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش را در سطح سلولی افزایش داده است. در همین رابطه، نتایج به‌دست‌آمده پیرامون اثر کاربرد اسید هیومیک بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه در شرایط تنش توسط محققان دیگر در گیاهان مختلفی همچون پنبه (Moosavi, 2019)، آفتابگردان (Hatami, 2017) ارزن (Saruhan *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2020) با یافته‌های حاضر مطابقت دارد.

در شرایط عدم تنش، کاربرد سطوح نیتروژن در مقایسه با عدم مصرف آن تاثیر معنی‌داری بر عملکرد دانه کوشیا نداشت. همچنین، عملکرد دانه تیمار شاهد کود نیتروژن در سه تیمار زمانی تنش خشکی در مقایسه با شرایط عدم تنش بالاتر بود (جدول ۶). این یافته‌ها نشان می‌دهد که در شرایط عدم تنش حصول عملکرد دانه نیاز به کاربرد کود شیمیایی نداشته است. هرچند در این مقاله نتایج مربوط به تولید علوفه کوشیا ارائه نشده است اما نتایج کلی پژوهش نشان‌دهنده اثر مثبت نیتروژن بر تولید علوفه و اثر معکوس آن بر تولید بذر کوشیا بوده است. در مطالعات پیشین عنوان شده است که در گیاهان علوفه‌ای کاربرد نیتروژن سبب تحریک رشد رویشی و تولید علوفه شده و در مقابل می‌تواند کاهش تولید دانه را در پی داشته باشد (Khaninejad, 2010; Rezaei Sokht-Abandani *et al.*, 2020). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان بیان داشت که گیاه کوشیا یک گیاه نیتروژن‌دوست بوده و مصرف نیتروژن در شرایط تنش و عدم تنش، فاز رویشی و تولید علوفه آن را به شدت تحریک کرده به‌طوری‌که در انتهای فصل نسبت بذر به اندام هوایی در سطوح مختلف تنش بسیار کاهش یافته است. (هرچند داده‌های مربوط به علوفه آن در این مقاله ارائه نشده، اما نتایج آزمایش آن را تایید کرده است). به همین دلیل در شرایط عدم کاربرد نیتروژن میزان تولید بذر نسبت به کاربرد نیتروژن بالاتر بوده است.

از سویی دیگر، بذر مال کردن کوشیا با اسید هیومیک در ابتدای فصل به‌ویژه در تیمارهایی که نیتروژن مصرف شده است می‌تواند عامل دیگری در تحریک رشد رویشی و به‌دنبال آن کاهش عملکرد دانه کوشیا در شرایط تنش و عدم تنش باشد. در همین رابطه، عنوان شده که اسید هیومیک از طریق کلات‌کنندگی عناصر غذایی ضروری گیاهی از جمله پتاسیم، کلسیم، منیزیم، روی، آهن، مس و سایر عناصر مهم نقش به‌سزایی در افزایش طول و وزن ریشه و آغازش ریشه‌های جانبی دارد (Aiken *et al.*, 1985; Oveysi & Ghoshchi, 2012; Khazaei *et al.*, 2013). لذا حضور این ترکیب همراه با نیتروژن در شرایط تنش می‌تواند باعث توسعه بالاتر ساختار ریشه‌ای و به دنبال آن افزایش توان گیاه در جذب آب و رشد و نمو و در نهایت تولید علوفه بالاتر گردد و به دنبال آن تاثیر منفی بر تولید دانه داشته باشد. اثر مثبت کاربرد نیتروژن بر عملکرد بذر تنها در سطح ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار تیمار اعمال تنش خشکی در مرحله پس از استقرار گیاهچه مشاهده شد (جدول ۶). از آن‌جا که کود نیتروژن خاصیت آبشویی بالایی دارد (Delfine *et al.*, 2005). لذا در تیمارهای تنش مراحل اولیه رشد، به دلیل غلظت بالاتر در محیط ریشه تاثیر مثبت بیشتری بر تخفیف اثرات تنش و در نهایت عملکرد نهایی آن داشته است.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که بروز تنش خشکی در مراحل رشد رویشی و زایشی تاثیر منفی بر گیاه کوشیا داشت. با این حال اثر آن در مراحل اولیه رشد رویشی (پس از استقرار) نسبت به تنش انتهای فصل (اواخر گل‌دهی) بیشتر بود. به طوری که در شرایط تنش خشکی ابتدای فصل رشد غلظت کلروفیل a و b، نسبت کلروفیل a به b و غلظت کارتنوئیدهای برگ در تنش انتهای فصل بالاتر از سایر تیمارهای تنش بود. تیمار بذر مال اسید هیومیک در مقایسه با تیمار تلفیقی آن با ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار کود نیتروژن در صفات غلظت فنل کل، غلظت کربوهیدرات محلول، ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH و در نهایت عملکرد دانه در غالب تیمارهای زمانی تنش تفاوتی نداشت و تاثیر مثبتی بر صفات یادشده در مقایسه با شرایط عدم تنش داشت. همچنین با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، سطح ۱۰۰ کیلوگرم در هکتار نیتروژن برای تلفیق با اسید هیومیک به‌صورت بذر مال برای کشت کوشیا در شرایط شوری و خشکی القا شده مناسب بود. به‌طور کلی با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان عنوان داشت که گیاه کوشیا در شرایط شوری شدید آب آبیاری و خشکی در مراحل مختلف رشدی مقاومت نسبی داشته و با کاربرد اسید هیومیک در ابتدای فصل و تلفیق آن با کود نیتروژن، توان گیاه را برای مقابله با شرایط تنش‌زای محیطی افزایش داد.

References

1. Abe, N., Murata, T., & Hirota, A. (1998). Novel 1,1-diphenyl-2-picryhy- drazyl- radical scavengers, bisorbicillin and demethyltrichodimerol, from a fungus. *Bioscience of Biotechnology and Biochemestry*, *62*, 661-662. https://doi.org/10.1271/bbb.62.661
2. Alizadeh, A., Najafi, F., Hadian, J., & Salehi, P. (2018). Effect of different levels of humic-acid and vermicompost extract on growth, yield, morphological and phytochemical properties of *Satureja khuzistanica*. *Journal of Agroecology*, *10*(1), 69-80. (in Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jag.v10i1.47161
3. Aiken, G. R., McKnight, D. M., Wershaw, R. L., & Mac Carthy, P. (1985). *Humic substances in soil, sediment, and water*. New York. USA: Wiley InterScience. https://doi.org/10.1002/gj.3350210213
4. Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review Plant Biology*, *55*, 373-399. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
5. Arnon, D. (1949). Copper enzyme polyphenoloxides in isolated chloroplast in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, *24*, 1-15. https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1
6. Arve, L. E., Torre, S., Olsen, J. E., & Tanino, K. K. (2011). *Stomatal responses to drought stress and air humidity*. In: Abiotic stress in plants mechanisms and adaptations (Eds. Shanker, A. K. and Venkateswarlu, B.) 267-280. InTech, Hyderabad, India. https://doi.org/10.5772/24661
7. Azevedo, R. A., & Lea, P. J. (2011). Research on abiotic and biotic stress what next? *Annual Applied of Biology*, *159*, 317-319. https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00500.x
8. Bates, L. S., Waldran, R. P., & Teare, I. D. (1973). Rapid determination of free proline for water studies. *Plant and Soil*, *39*, 205-208. https://doi.org/10.1007/BF00018060
9. Delfine, S., Tognetti, R., Desiderio, E., & Alvino, A. (2005). Effect of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. *Agronomy Sustainable*, *25*, 183-191. https://doi.org/10.1051/agro:2005017
10. Dinha, T. H., Watanabea, K., Takaragawa, H., Nakabarua, M., & Kawamitsu, Y. (2017). Photosynthetic response and nitrogen use efficiency of sugarcane under drought stress conditions with different nitrogen application levels. *Plant Production Science*, *20*(4), 412-422. https://doi.org/10.1080/1343943X.2017.1371570
11. Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, *28*, 350-356. https://doi.org/10.1021/ac60111a017
12. Dong, L., Córdova-Kreylos, A., Yang, J., Yuan, H., & Scow, K. M. (2009). Humic acids buffer the effects of urea on soil ammonia oxidizers and potential nitrification. *Soil Biology and Biochemistry*, *41*(8), 1612-1621. https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.04.023
13. Gholinezad, E., Aynaband, A., Hassanzade ghorthapeh, A., Noormohamadi, G., & Bernousi, I. (2009). Study of the effect of drought stress on yield, yield components and harvest index of sunflower hybrid iroflor at different levels of nitrogen and plant population. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, *37*(2), 85-94. https://doi.org/10.15835/nbha3723255
14. Hatami, H. (2017). The effect of zinc and humic acid applications on yield and yield components of sunflower in drought stress. *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, *4*(1), 36-39. https://doi.org/10.18178/joaat.4.1.36-39
15. Kafi, M., Borzoei, A., Salehi, M., Kamandi, A., Masoumi, A., & Nabati, J. (2010). *Physiology of environmental stresses in plants*. Jahad daneshgali Mashhad press. 504 pp.

16. Khaninejad, S. (2010). Study the effects of nitrogen and phosphorous levels on physiological, forage characteristics, grain yield and crude protein of *Kochia scoparia* in irrigating with two saline waters. MSc thesis. Ferdowsi University of Mashhad. 115p.
17. Kaya, C., Şenbayram, M., Akram, N. A., Ashraf, M., Alyemeni, M. N., & Ahmad, P. (2020). Sulfur-enriched leonardite and humic acid soil amendments enhance tolerance to drought and phosphorus deficiency stress in maize (*Zea mays* L.). *Scientific Reports*, *10*(1), 1-13. https://doi.org/10.1038/s41598-020-62669-6
18. Kaur, S., Gupta, A. K., & Kaur, N. (2002). Effect of osmo and hydropriming of chickpea seeds on seedling growth and carbohydrate metabolism under water deficit stress. *Plant Growth Regulation*, *37*, 17-22. https://doi.org/10.1023/A:1020310008830
19. Khazaei, H. R., Nezami, A., Eyshi Rezaei, E., Saeidnejad, A. H., & Pouramir, F. (2013). Evaluation of the effect of Humic substance types and concentrations on germination and seedling properties of two triticale (*Triticosecale hexaploide* Lart.) varieties. *Journal of Agroecology*, *4*(4), 273-281. (in Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jag.v4i4.17801
20. Khorasaninejad, S., Alizadeh Ahmadabadi, A., & Hemmati, K. (2018). The effect of humic acid on leaf morphophysiological and phytochemical properties of *Echinacea purpurea* L. under water deficit stress. *Scientia Horticulturae*, *239*, 314-323. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.015
21. Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions*, *11*, 591-592. https://doi.org/10.1042/BST0110591
22. Mohsenzadeh, S., Malboobi, M. A., Razavi, K., & Farrahi-Aschtiani, S. (2006). Physiological and molecular responses of *Aeluropus lagopoides* (Poaceae) to water deficit. *Environmental and Experimental Botany*, *56*, 314-322. https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.03.008
23. Moosavi, G. R. (2019). Effect of humic Acid and mycorrhiza application on morphological traits and yield of cotton under drought stress. *Agriculture and Sustainable Development*, *30*(1), 121-139. https://doi.org/10.22059/jci.2019.282993.2228
24. Nabati, J., Kafi, M., Masoumi, A., Zare Mehrjerdi, M., & Boroumand Rezazadeh, E. (2018). Salinity stress and some physiological relationships in Kochia (*Kochia scoparia*). *Environmental Stresses in Crop Sciences*, *11*(2), 401-412. (in Persian with English abstract). https://doi.org/10.22077/escs.2017.151.1036
25. Oveysi, M., & Ghoshchi, F. (2012). Study of humic acid role on reduction of water deficit stress effects on crops. *Agriculture and Sustainable Development*, *43*, 12-16. (in Persian with English abstract).
26. Pizzeghello, D., Nicolini, G., & Nardi, S. (2001). Hormone-like activity of humic substances in *Fagus sylvatica* forests. *New Phytology*, *151*, 647-657. https://doi.org/10.1046/j.0028-646x.2001.00223.x
27. Rezaei Sokht-Abandani, R., Siadat, S. A., Pazoki, A., Lak, Sh., & Mojaddam, M. (2020). Effect of drought stress, different levels of nitrogen and potassium fertilizer on some physiological and agronomical traits of maize hybrid (*Zea mays* L) cv. single cross 704. *Journal of Plant Ecophysiology*, *12*, 40-52. (in Persian with English abstract). https://dorl.net/dor/20.1001.1.20085958.1399.12.40.4.9
28. Riasi, A., Danesh Mesgaran, M., Stern, M. D., & Ruiz Moreno, M. J. (2008). Chemical composition, in situ ruminal degradability and post-ruminal disappearance of dry matter and crude protein from the halophytic plants *Kochia scoparia*, *Atriplex dimorphostegia*. *Suaeda arcuata* and *Gamanthus gamacarpus*. *Animal Feed Science and Technology*, *141*(3), 209-219. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.06.014
29. Sabzevari, S., & Khazaei, H. R. (2009). The effect of foliar application with humic acid on growth, yield and yield components of wheat *(Triticum aestivum* L.). *Journal of Agroecology*, *1*(2), 53-63. (in Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/jag.v1i2.2686
30. Salehi, M., Kafi, M., & Kiani, A. R. (2012). Salinity and water effects on growth, seed production and oil content of *Koshia scoparia*. *Journal of Agronomy*, *11*(1), 1-8. https://doi.org/10.3923/ja.2012.1.8
31. Saravia, D., Farfán-Vignolo, E. R., Gutiérrez, R., De Mendiburu, F., Schafleitner, R., Bonierbale, M. A., & Khan, M. (2016). Yield and physiological response of potatoes indicate different strategies to cope with drought stress and nitrogen fertilization. *American Journal of Potato Research*, *93*, 288-295. https://doi.org/10.1007/s12230-016-9505-9
32. Saruhan, V., Kusvuran, A., & Babat, S. (2011). The effect of different humic acid fertilization on yield and yield components performances of common millet (*Panicum miliaceum* L.). *Scientific Research and Essays*, *6*(3), 663-669. https://doi.org/10.5897/SRE10.1153
33. Setayesh mehr, Z., Khajeh, H., Esmaeilzadeh, B., & Sabbagh, S. K. (2012). Changes on proline, phenolic compounds and activity of antioxidant enzymes in *Anethum graveolens* L. under salt stress. *International Journal of Agronomy and Plant Production*, *3*, 710-715.
34. Shen, J., Guo, M., Wang, Y., Yuan, X., Wen, Y., Song, X., Dong, S., & Guo, P. (2020). Humic acid improves the physiological and photosynthetic characteristics of millet seedlings under drought stress. *Plant Signaling and Behavior*, *15*(8), 1-13. https://doi.org/10.1080/15592324.2020.1774212

35. Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Ecology and Viticulture, 16*, 144-158. https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144
36. Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I. M., & Murphy, A. (2015). *Plant Physiology and Development*. published by Sinauer Associates. ISBN-13 978-1605353531
37. Tran, T., Kano-Nakata, M., Takeda, M., Menge, D., Mitsuya, S., Inukai, Y., & Yamauchi, A. (2014). Nitrogen application enhanced the expression of developmental plasticity of root systems triggered by mild drought stress in rice. *Plant and Soil*, *378*, 139-152. https://doi.org/10.1007/s11104-013-2013-5